

間葉系幹細胞を用いた3次元骨形成モデルの開発と利用

平野 雄（管理栄養学科・教授）

【はじめに】

本研究では、骨粗鬆症などの骨疾患予防に有用な食品因子を検索するための3次元骨モデルの構築を目指す。ヒト間葉系幹細胞を3次元的に培養し、同時に骨への分化を誘導させることで骨組織類似の構造、いわゆる骨オルガノイドの作製を試みる。初年度は、骨オルガノイドを作製するための基礎実験および文献調査を中心に実施し、最終年度で実際の骨オルガノイドを作製する。

【研究の背景】

我が国における骨粗鬆症の患者数は、現在1,300万人と言われ、今後、高齢化に伴い、更に増加すると考えられる。骨粗鬆症は予防が重要であり、そのためには栄養学的な介入が不可欠である。そこで、間葉系幹細胞を用いた3次元骨モデルを構築し、その骨芽細胞分化誘導を行なう過程に食品因子を負荷することで、それら食品因子がどのような効果をもたらすのかを検討できれば、効率的に骨粗鬆症予防の食品因子を検索できる。以上の理由で、骨粗鬆症予防に有効な食品因子を検索できる手軽で効率的なシステムの構築を目指す。

これまで、当研究室では、食品因子として大豆イソフラボンのひとつであるゲニステインを用い、骨芽細胞分化に与える効果を2次元の培養細胞レベルで検討してきた（平成27年度・28年度学術研究所研究助成）。その研究では、ゲニステインの骨細胞分化に対する促進的な効果は確認できたものの、実際に骨形成にどのような影響を及ぼすのかは確認できていない。

従来、食品因子の生体に与える影響を調べるためには、ボランティアに目的の食品因子を摂取してもらったり、実験動物に経口摂取させたり、あるいは培養細胞に負荷したりして行なわれてきた。しかし、ヒトや実験動物を用いた調査では、倫理上の問題があり、また培養細胞を用いた研究では、生体との解離があるため、得られる情報に限界があった。従って、ヒトや実験動物を用いずに、倫理問題が発生せず、かつ生体に近い情報が得られるモデルが望まれる。即ち、生体を用いずに、生体に近いモデル（以下、臓器類似モデル）を構築する必要がある。

しかし、骨に関しては、現在までのところ、臓器類似モデルは存在していない。そこで、本研究で、骨の臓器類似モデルを新たに作製し、ゲニステインなどの食品因子の骨形成に与える影響を調べる検索システムの構築への足掛かりとしたい。

近年、iPS細胞などの幹細胞操作技術や応用が進み、人工的な臓器を作り、疾病治療に応用するなどの再生医療が注目されている。その中で、幹細胞を用いた細胞塊を特定の臓器に近いモデルとして構築したものを、単なる細胞塊（スフェロイド）と区別してオルガ

ノイド (organoid) と呼んでいる。即ち、人為的に創出された器官・臓器に類似した組織体がオルガノイドなのである。これまでに、すでに様々な臓器オルガノイドが作製され、幅広い研究に応用されている (表 1)。オルガノイドの重要な役割は、これまで研究対象とすることが困難であったヒトに対する様々な生命現象に迫ることにある。

本研究では、ヒト間葉系幹細胞を用いた骨モデル (以下、骨オルガノイド) の手軽で効率的な作製方法の開発を目指す。

表 1

オルガノイドの種類	概要	参考文献
消化管オルガノイド	各種の消化管組織由来の幹細胞を用いて、細胞増殖および分化を経て形成される消化管上皮の三次元初代培養。動物の組織レベルの生理反応を、 <i>in vitro</i> で再現することが可能。	1, 2
肝臓オルガノイド	生物由来のハイドロゲル基盤であるマトリゲルを用いて、未分化な3種類の細胞 (内胚葉細胞、間葉系幹細胞、血管内皮細胞) を共培養させることで作製される。	3, 4
膵臓オルガノイド	ヒト多能性幹細胞から内胚葉を誘導し、複数の因子を段階的に添加することで、機能的な β 細胞の作製が可能である。	5, 6, 7
肺オルガノイド	多能性幹細胞由来の内胚葉を用いて、FGF 経路や BMP 経路、TGF- β 経路等を制御すると、前腸を経て、肺オルガノイドが形成される。	8, 9
腎オルガノイド	胎仔後腎から単離した尿管芽を培養し、樹状分岐を再現したもの。	10, 11
眼杯オルガノイド	ES 細胞塊を培養すると 5 日後までに、連続的に形成される眼組織様の上皮構造から眼杯様の構造が形成される。	12, 13, 14
がんオルガノイド	ヒト大腸がんの培養技術とゲノム編集技術を用いて作製する。	15

表 1 に示したように、現在までに再生医療技術の進展に伴い、種々の臓器オルガノイドの作製方法が報告されている。このような最新のオルガノイド作製技術を用いれば骨オルガノイド作製も可能であり、食品因子の骨形成への影響を検索できる有用な 3 次元骨モデルが構築できるものと考えられる。

【骨オルガノイドの作製方法】

1. スフェロイド作製方法の選択

現在、知られているスフェロイド作製方法、すなわち 3 次元培養方法には、大きく 3 つの方法がある。1 つは微細なウェルをプレート上に作製し、その中で細胞を培養することで、細胞塊を形成させる方法、2 つめにはプレート底面上で均一のスフェロイドが形成できる工夫をこらしたもので、細胞の接着面に特殊な物質をコーティングすることで細胞浮遊液が表面張力で塊を形成し、その中でスフェロイドを形成させる方法である。3 つめが hanging drop 法と呼ばれる方法で、適量の細胞浮遊液を細胞培養ディッシュの蓋の裏面に

貼付し、そのまま培養を続けると、滴の中で細胞同士が凝集し、細胞塊すなわちスフェロイドが形成する方法である。このように形成されたスフェロイドは単なる細胞塊ではなく、各細胞がそれぞれの役割を持った臓器様構造、すなわちオルガノイドを形成することがある(16)。

本研究では、比較的簡便に実施でき、一度に多くのスフェロイドを効率的に作製することが可能な手法であることから、**hanging drop**法を採用することにした。

2. 培地の調整

幹細胞にはヒト間葉系幹細胞株 **UBE6T-15** (**HSRRB**、大阪)を用いる。**UBE6T-15**の維持培養には、間葉系幹細胞用培地 **MSCGM** (ロンザジャパン、東京) (以下、**MSCGM** 維持培地)を、骨芽細胞誘導に用いる培地として **Osteogenic Differentiation Medium Bullet Kit** (ロンザジャパン)を添加した **MSCGM** 培地 (以下、**MSCGM** 分化誘導培地)を用いる。**hanging drop**法を開始する前のサブカルチャーまでの細胞培養には、10% **FBS** (**GIBCO-BRL**、**Grand Island**、**NY**) 添加 **DMEM** 培地 (**Sigma**、**St. Louis**、**MO**)を用いる。

3. 生細胞数の測定

細胞生存率の測定はトリパンブルー色素排除試験法 (0.5%トリパンブルー溶液) (ナカライテスク、京都)により行なう。回収した細胞をトリパンブルー溶液に1:1の割合で混合し、ビルケルチュルク血球計算盤を用いて生細胞をカウントする。

4. ヒト間葉系幹細胞のサブカルチャー

10% **FBS** 添加 **DMEM** 培地で調整し増殖させた **UBE6T-15**を、10% **FBS** 添加 **MSCGM** 維持培地中に浮遊させ、培養ディッシュに 2.5×10^4 cells / mL の細胞密度で播種する。コンフルエントに達する直前にトリプシン溶液 (ナカライテスク)を用いて回収し、至適細胞数に調整した後、**hanging drop**法に供する。

5. hanging drop 作製に必要な至適細胞数の検討

前段階としての基礎実験の結果、**hanging drop**を作製するために最適な細胞密度は、 1×10^5 cells / mLであった。以後、原則として**hanging drop**を作製する際にはこの細胞密度に調整することとするが、今後の観察結果によっては、適宜、細胞密度を変えて実験を実施するものとする。

6. hanging drop 法

骨オルガノイドの作製には**hanging drop**法を用いる。サブカルチャーした10% **FBS** 添加 **MSCGM** 維持培地中の **UBE6T-15**を回収し、10% **FBS** 添加 **MSCGM** 分化誘導培地に培地交換した後、 1×10^5 cells / mLに調整する。この細胞浮遊液を、15 μ L ずつ、100mm ディッシュの裏に貼付する (**hanging drop**作製、図1)。1枚のディッシュ蓋に貼付する**hanging drop**はおおよそ30滴とする。また、乾燥予防目的で、ディッシュに3 mL程度の **Phosphate Buffer Saline (PBS)**を添加する。**hanging drop**は作製後、**CO₂** インキュベーター (37°C) 内に9日間静置する。**hanging drop**内のスフェロイドの様子は随時、光学顕微鏡で観察する。

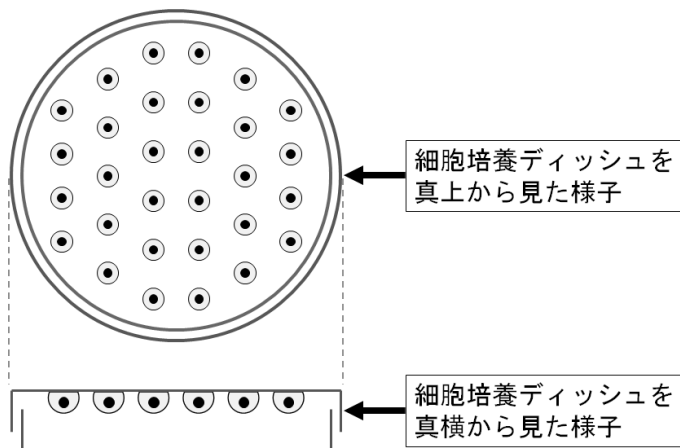


図1 hanging drop 法の模式図：細胞培養ディッシュの蓋の裏面に30滴の細胞浮遊液を貼付している。細胞浮遊液の細胞密度は 1×10^5 cells / mL であり、各滴の容量は15 μ L である。

7. 骨形成のための分化誘導

骨組織への分化誘導は、hanging drop 内で行なわれる。即ち、hanging drop 内でスフェロイドを形成する過程で骨組織に分化するように、hanging drop に用いる培地に **Osteogenic Differentiation Medium Bullet Kit** を添加する。

8. 骨オルガノイドの組織切片作製

形成された骨オルガノイドは、極めて微小でかつ脆弱なため、通常の方法でのパラフィン包埋は困難である。そこで、独自の方法で組織切片の作製に取り組む。方法の概要は以下の通りである。

- ① hanging drop 中に形成されたスフェロイドを、一旦、24ウェル培養プレートにパスツールピペットを用いて移植する。この際、1ウェルにつき細胞塊を1つずつ移植する。培地には、10% FBS 添加 MSCGM 分化誘導培地を用いる。プレートにスフェロイドを移植した後、数日間、静置して培養を続ける。
- ② スフェロイドの入っているウェルから培地を除去し、生理食塩水による洗浄を3回行なう。
- ③ 作製済みの固定液を適量添加し、24時間静置する。
- ④ 固定終了後、固定液を取り除き、70% エタノールで洗浄を3回行なう。3回目はovernightで静置する。
- ⑤ 99.5% エタノールで脱水を30分5回行なう。
- ⑥ 100% エタノールで脱水を30分1回行なう。
- ⑦ 融解したパラフィンを添加することで、パラフィン置換を行なう。
- ⑧ パラフィン置換が完成した後、パラフィン包埋を行なう。
- ⑨ パラフィン包埋された組織から、ミクロトームを用いて組織切片を作製する。
- ⑩ 以後、定法に従い、脱パラフィン等を行ない、アルカリフォスファターゼ染色を施した後、光学顕微鏡で観察する。

9. アルカリフォスファターゼ染色

パラフィン包埋したスフェロイドから作製した切片をスライドガラス上で、**TRACP & ALP double-stain Kit**（タカラバイオ、草津）を用いてアルカリフォスファターゼ染色を実施する。染色されたスフェロイドの内部構造を光学顕微鏡（ECLIPSE TS100、ニコン、東京）下で観察する。

10. 統計解析

骨オルガノイド作製方法を構築した後、骨芽細胞を分化誘導する過程で、ゲニステインを始めとする、様々な食品因子を添加し、その骨オルガノイド形成に与える影響を調査する。その際に用いる群間比較は **SPSS statistical software ver. 14.0**（SPSS, Chicago, IL）を用いて行ない、 $p < 0.05$ をもって有意とする。

【結語】

本研究では、3次元骨モデルの作製方法として **hanging drop** 法を採用し、骨芽細胞分化を誘導することで、ヒト間葉系幹細胞を単なるスフェロイドではなく、臓器類似構造体であるオルガノイドを作製する計画を準備した。次年度では、実際に3次元骨モデルとして有用な骨オルガノイドが作製できるかを検討する。

【文献】

1. Mahe M.M., Aihara E., Schumacher M.A., Zavros Y., Montrose M.H., Helmrath M.A., Sato T., Shroyer N.F. Establishment of gastrointestinal epithelial organoids. *Curr Protoc Mouse Biol* 3, 217-240, 2013
2. Mahe M.M., Sundaram N., Watson C.L., Shroyer N.F., Helmrath M.A. Establishment of human epithelial enteroids and colonoids from whole tissue and biopsy. *J Vis Exp* 97, e52483, 2015
3. Takebe T., Sekine K., Enomura M., Koike H., Kimura M., Ogaeri T., Zhang R.R., Ueno Y., Zheng Y.W., Koike N., Aoyama S., Adachi Y., Taniguchi H. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* 499, 481-484, 2013
4. Takebe T., Enomura M., Yoshizawa E., Kimura M., Koike H., Ueno Y., Matsuzaki T., Yamazaki T., Toyohara T., Osafune K., Nakauchi H., Yoshikawa H.Y., Taniguchi H. Vascularized and complex organ buds from diverse tissues via mesenchymal cell-driven condensation. *Cell Stem Cell* 16, 556-565, 2015
5. Pagliuca P.W., Millman J.R., Gürtler M., Segel M., Van Dervort A., Ryu J.H., Peterson Q.P., Greiner D., Melton D.A. Generation of functional human pancreatic β cells in vitro. *Cell* 159, 428-439, 2014
6. Toyoda T., Mae S., Tanaka H., Kondo Y., Funato M., Hosokawa Y., Sudo T., Kawaguchi Y., Osafune K. Cell aggregation optimizes the differentiation of human ESCs and iPSCs into pancreatic bud-like progenitor cells. *Stem Cell Res* 14, 185-197, 2015
7. Kim Y., Kim H., Ko U.H., Oh Y., Lim A., Sohn J.W., Shin J.H., Kim H., Han Y.M. Islet-like organoids derived from human pluripotent stem cells efficiently function in the glucose responsiveness in vitro and in vivo. *Sci Rep* 6, 35145, 2016

8. Barkauskas C.E., Chung M.I., Fioret B., Gao X., Katsura H., Hogan B.L. Lung organoids: current uses and future promise. *Development* 144, 986-997, 2017
9. Chen Y.W., Huang S.X., de Carvalho A.L.R.T., Ho S.H., Islam M.N., Volpi S., Notarangelo L.D., Ciancanelli M., Casanova J.L., Bhattacharya J., Liang A.F., Palermo L.M., Porotto M., Moscona A., Snoeck H.W. A three-dimensional model of human lung development and disease from pluripotent stem cells. *Nat Cell Biol* 19, 542-549, 2017
10. Qiao J., Sakurai H., Nigam S.K. Branching morphogenesis independent of mesenchymal-epithelial contact in the developing kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 7330-7335, 1999
11. Rosines E., Sampogna R.V., Johkura K., Vaughn D.A., Choi Y., Sakurai H., Shah M.M., Nigam S.K. Staged in vitro reconstitution and implantation of engineered rat kidney tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 20938-20943, 2007
12. Eiraku M., Takata N., Ishibashi H., Kawada M., Sakakura E., Okuda S., Sekiguchi K., Adachi T., Sasai Y. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature*, 472, 51-56, 2011
13. Nakano T., Ando S., Takata N., Kawada M., Muguruma K., Sekiguchi K., Saito K., Yonemura S., Eiraku M., Sasai Y. Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. *Cell Stem Cell*, 10, 771-785, 2012
14. Hasegawa Y., Takata N., Okuda S., Kawada M., Eiraku M., Sasai Y. Emergence of dorsal-ventral polarity in ESC-derived retinal tissue. *Development* 143, 3895-3906, 2017
15. Fujii, M., Shimokawa M., Date S., Takano A., Matano M., Nanki K., Ohta Y., Toshimitsu K., Nakazato Y., Kawasaki K., Uraoka T., Watanabe T., Kanai T., Sato T. A colorectal tumor organoid library demonstrates progressive loss of niche factor requirements during tumorigenesis. *Cell Stem Cell* 18, 827-838, 2016
16. Yamashita A., Asahi J., Takaki M., Nakashima T., Kamiwada K., Watanabe S., Murakami D., Hirano T. Effects of ethanol on mouse embryonic stem cell differentiation. *Int J Pharm Pharm Sci*, 7, 5, 2015